

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006423

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-091681  
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 6 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 1 6 8 1

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

J P 2 0 0 4 - 0 9 1 6 8 1

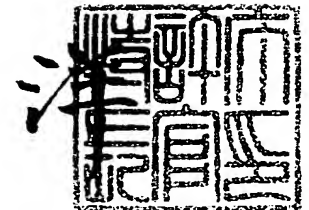
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): 富士写真フイルム株式会社

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P048142  
【提出日】 平成16年 3月26日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/10  
C07H 21/00

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会  
社内  
【氏名】 猪股 弘子

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会  
社内  
【氏名】 半戸 里江

【特許出願人】  
【識別番号】 000005201  
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100105647  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小栗 昌平  
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】  
【識別番号】 100105474  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 本多 弘徳  
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】  
【識別番号】 100108589  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 市川 利光  
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】  
【識別番号】 100115107  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 高松 猛  
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】  
【識別番号】 100090343  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 濱田 百合子  
【電話番号】 03-5561-3990

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 092740  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0003489

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

(1) R N AとD N Aを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜内を通過させて、核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔膜を洗浄する工程、(3) 回収液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、該多孔膜内から核酸を脱着させる工程を含み、該洗浄液が、水溶性有機溶媒を50質量%以下の濃度で含有し、かつカオトロピック塩を含有しない洗浄液であることを特徴とする、R N A又はD N Aを選択的に回収する分離精製方法。

【請求項 2】

上記洗浄液中の水溶性有機溶媒の濃度が、20～40質量%である、請求項1記載のR N A又はD N Aを選択的に回収する分離精製方法。

【請求項 3】

核酸吸着性多孔膜が、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着する、有機高分子からなる多孔膜である、請求項1又は2に記載のR N A又はD N Aを選択的に回収する分離精製方法。

【請求項 4】

核酸吸着性多孔膜が、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜である、請求項1～3の何れかに記載のR N A又はD N Aを選択的に回収する分離精製方法。

【請求項 5】

多孔膜がアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹼化処理した有機材料からなる多孔膜である請求項1～4に記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 6】

多孔膜が、表裏非対称性の多孔膜である、請求項1～5の何れかに記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 7】

試料溶液が、細胞またはウイルスを含む検体をR N A可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した液である、請求項1～6の何れかに記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 8】

R N A可溶化試薬が、カオトロピック塩、還元剤及び界面活性剤を含む、請求項7に記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 9】

水溶性有機溶媒が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブチルアルコール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールである、請求項1～8の何れかに記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 10】

洗浄液が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブタノール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールを20～50質量%含む溶液である、請求項1～9の何れかに記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 11】

核酸吸着性多孔膜に吸着したR N Aを脱着せしめうる回収液が、塩濃度が0.5M以下の溶液である、請求項1～10の何れかに記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 12】

前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液の核酸吸着性多孔膜への通過を、少なくとも二個の開口を有する容器内に溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジ及び圧力発生装置を用いて行い、且つ、該圧力発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである請求項1～11の何れかに記載のR N A又はD N Aの選択的分離精製方法。

【請求項 13】

請求項1～12の何れかに記載の核酸分離精製工程を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【請求項14】

請求項1～12の何れかに記載の核酸分離精製方法を自動で行う装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸の分離精製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸を分離精製する方法に関する。より詳細には、本発明は、RNAとDNAを含む核酸混合物からRNA又はDNAを分離精製する方法に関する。さらに詳しくは、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、RNAとDNAを含む核酸混合物からRNA又はDNAを分離精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形態で用いることが要求される。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の形態で種々の目的に用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料から核酸を精製する場合には、コンタミネーション（汚染）および疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた分離精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、これに引き続いて洗浄、脱着等の操作を行い、分離精製する方法がある（例えば、特許文献1）。この方法は、分離性能として優れているが、簡便性、迅速性、自動化適性において充分とは言えず、またこの方法に用いられる器具及び装置は自動化及び小型化に不向きであり、更に器具及び装置、特に吸着体を同一性能で工業的に大量生産することが困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。さらに、素材自体が脆いために機械的強度を得るには一定以上の厚みが必要となるため、特にDNAとRNAの混合試料からRNAを選択的に回収する際、DNAase等の高価な試薬を用いる必要がある等の問題がある。

【0006】

また、簡便かつ効率よく核酸を分離精製する方法の一つとして、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させることによって、核酸を分離精製する方法が記載されている（特許文献2、3）。

【0007】

その他に、従来から知られている核酸分離精製法としては、遠心法によるもの、磁気ビーズを用いるもの、フィルターを用いるものなどがあり、これらを利用した核酸分離精製装置が提案されている。例えば、フィルターを用いた核酸分離性装置としては、フィルターを収容したフィルターチューブをラックに多数セットし、これに核酸を含む試料液を分注し、上記ラックの底部の周囲をシール材を介してエアチャンバーで密閉して内部を減圧し、全フィルターチューブを同時に排出側より吸引し試料液を通過させて核酸をフィルターに吸着し、その後、洗浄液および回収液を分注して、同様に減圧吸引して洗浄・脱着するようにした機構が提案されている（例えば、特許文献4参照）。

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【特許文献2】特開2003-128691号公報

【特許文献3】特開2004-49108号公報

【特許文献4】特許第2832586号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、従来の核酸分離精製方法では、DNAとRNAが混在する混合溶液からDNA又はRNAを効率的に精度良く分離精製する方法については格別記載されていない。

従って本発明の目的は、検体中の核酸を核酸吸着性の多孔膜に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製するより安価な方法であって、分離性能に優れ、洗浄効率がよく、簡便で、迅速で、自動化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である多孔膜を使用した核酸の分離精製方法を提供することにある。特にRNAとDNAの混合試料から、RNA又はDNAを選択的に回収する、より安価な分離精製方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、RNAとDNAを含む核酸混合物を多孔膜に吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法において、洗浄液中のアルコール濃度を50質量%以下にすることで、DNAを溶離させ、RNA又はDNAを選択的に分離精製できることを見出し、本発明を完成したものである。更に本発明では、回収液として塩濃度が0.5M以下の水溶液を用いることによって、RNAを高純度で、かつ高収量で分離精製することができる。また、本発明では、該多孔膜としてイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔膜を用いることが本発明の効果を得る上で好ましく、更に、本発明においては、二個の開口を有する容器内に有機高分子からなる多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを使用することが好ましい。即ち、本発明は、下記の構成よりなるものである。

【0010】

1. (1) RNAとDNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜内を通過させて、核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔膜を洗浄する工程、(3) 回収液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、該多孔膜内から核酸を脱着させる工程を含み、該洗浄液が、水溶性有機溶媒を50質量%以下の濃度で含有し、かつカオトロピック塩を含有しない洗浄液であることを特徴とする、RNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【0011】

2. 上記洗浄液中の水溶性有機溶媒の濃度が、20～40質量%である、上記第1項記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【0012】

3. 核酸吸着性多孔膜が、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着する、有機高分子からなる多孔膜である、上記第1項又は第2項に記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【0013】

4. 核酸吸着性多孔膜が、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜である、上記第1～3項の何れかに記載のRNA又はDNAを選択的に回収する分離精製方法。

【0014】

5. 多孔膜がアセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を酸化处理した有機材料からなる多孔膜である上記第1～4項に記載のRNAの選択的分離精製方法。

【0015】

6. 多孔膜が、表裏非対称性の多孔膜である、上記第1～5項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0016】

7. 試料溶液が、細胞またはウイルスを含む検体をRNA可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した液である、上記第1～6項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0017】

8. RNA可溶化試薬が、カオトロピック塩、還元剤及び界面活性剤を含む、上記第7項に記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0018】

9. 水溶性有機溶媒が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブチルアルコール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールである、上記第1～8項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0019】

10. 洗浄液が、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ならびにブタノール及びその異性体から選択される少なくとも1種のアルコールを20～50質量%含む溶液である、上記第1～9項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0020】

11. 核酸吸着性多孔膜に吸着したRNAを脱着せしめうる回収液が、塩濃度が0.5M以下の溶液である、上記第1～10項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0021】

12. 前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液の核酸吸着性多孔膜への通過を、少なくとも二個の開口を有する容器内に溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用いて行うものである上記第1～11項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0022】

13. 核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液の核酸吸着性多孔膜への通過を、圧力発生装置を用いて行い、且つ、該圧力発生装置が、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである上記第1～12項の何れかに記載のRNA又はDNAの選択的分離精製方法。

【0023】

14. 上記第1～13項の何れかに記載の核酸分離精製工程を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【0024】

15. 上記第1～13項の何れかに記載の核酸分離精製方法を自動で行う装置。

【発明の効果】

【0025】

本発明によれば、分離性能に優れ、洗浄効率がよく、簡便で、迅速で、自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である多孔膜を使用した核酸の分離精製方法であって、DNAとRNAの混合試料から、より安価で、簡便にRNA又はDNAを選択的に回収することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明の核酸分離精製方法は、(1)RNAとDNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜内を通過させて、核酸を吸着させる工程、(2)洗浄液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、核酸が吸着した状態で核酸吸着性多孔膜を洗浄する工程、(3)回収液を該核酸吸着性多孔膜に通過させて、該多孔膜内から核酸を脱着させる工程を少なくとも含むものである。

【0027】



好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、DNAとRNAを含む核酸混合物溶液、洗浄液又は回収液を、圧力発生装置を用いて核酸吸着性多孔膜に通過させるものであり、より好ましくは、上記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二つの開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液、又は回収液を注入し、カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、注入した各液を通過させ、他の開口より排出させるものである。DNAとRNAを含む核酸混合物溶液、洗浄液、又は回収液を加圧状態で上記多孔膜に通過させることにより、装置をコンパクトに自動化することができ、好ましい。ポンプの加圧は、好ましくは10～300kPa、より好ましくは40～200kPaの範囲で行われる。

#### 【0028】

さらに好ましくは、上記核酸吸着性多孔膜を収容する核酸分離精製カートリッジを用いて、以下の工程でRNAとDNAを分離精製することができる。

すなわち、(a) DNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、少なくとも二つの開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入したDNAとRNAを含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程、(d)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程、(f)核酸分離精製カートリッジの一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程が挙げることができる。

#### 【0029】

上記の核酸分離精製の工程では、最初の核酸を含む試料液を注入から核酸分離精製カートリッジ外に核酸を得るまでの工程を実質20分以内、好適な状況では2分以内で終了することが可能である。

#### 【0030】

また、上記の核酸分離精製の工程では、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)が、DNAの場合は1.6～2.0、RNAの場合は1.8～2.2となる純度を持つ核酸を回収することができ、不純物混入量の少ない高純度の核酸を定常的に得ることができる。さらには、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)がDNAの場合は1.8付近、RNAの場合は2.0付近となる純度を持つ核酸を回収することができる。

#### 【0031】

また、上記工程において、圧力差発生装置としては、注射器、ピペッタ、ペリスタポンプのような加圧が可能なポンプ等、或いは、エバポレーター等の減圧可能なものが挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペッタは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されている。

#### 【0032】

また、上記工程において、上記核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にしても好適に実施できる。また、核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させることによっても好適に実施することができる。

### 【0033】

本発明において使用できる検体は、核酸を含むものであれば特に制限はなく、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）、細菌、ウイルスなど、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

### 【0034】

これらの検体は、通常、細胞膜・核膜を溶解して核酸を溶出する試薬を含む水溶液（核酸可溶化試薬）で処理する。これにより細胞膜・核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散し、核酸を含む試料溶液を得る。

### 【0035】

以下に、細胞膜・核膜を溶解し、核酸を溶出して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程について説明する。該工程は、通常、(I)細胞又はウイルスを含む検体を容器に注入する工程、(II)上記容器に、カオトロピック塩と界面活性剤を含む核酸可溶化試薬溶液を添加し、検体と核酸可溶化試薬溶液を混合する工程、及び(III)上記で得られた混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程を包含する。

### 【0036】

細胞膜・核膜を溶解して核酸を溶出するには、核酸可溶化試薬を用いる。核酸可溶化試薬としては、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤および／又は核酸安定化剤を含む溶液が挙げられる。

### 【0037】

上記、核酸可溶化試薬中のカオトロピック塩濃度は、0.5 M以上であることが好ましく、より好ましくは0.5 M～8 M、さらに好ましくは、1 M～6 Mである。上記カオトロピック塩としては、塩酸グアニジンが好ましいが、他のカオトロピック塩（イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン）を使用することもできる。また、これらの塩は単独または複数組み合わせ用いてもよい。

### 【0038】

上記、核酸可溶化試薬中の界面活性剤は、例えば、ノニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、両性界面活性剤である。本発明においてはノニオン界面活性剤を好ましく用いることができる。ノニオン界面活性剤は、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤、脂肪酸アルカノールアミドを用いることができるが、好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤を用いることができる、さらに好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤は、POEデシルエーテル、POEラウリルエーテル、POEトリデシルエーテル、POEアルキレンデシルエーテル、POEソルピタンモノラウレート、POEソルピタンモノオレエート、POEソルピタンモノステアレート、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルピット、POEアルキルアミン、POEアセチレングリコールから選択されるポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤である。

### 【0039】

また、カチオン界面活性剤も好ましく用いることができる。さらに好ましくは、カチオン界面活性剤は、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリドから選択されるカチオン界面活性剤である。これらの界面活性剤は、単独または複数組み合わせ用いてもよい。これら界面活性剤の核酸可溶化試薬溶液における濃度は0.1～20質量%であることが好ましい。

### 【0040】

核酸可溶化試薬には、核酸安定化剤を共存させることが好ましい。検体中には、核酸を分解するヌクレアーゼ等が含まれていることがあり、検体をホモジナイズすると、ヌクレアーゼが核酸に作用し、収量が減少することがある。これを回避する目的で、核酸可溶化液に、ヌクレアーゼを不活性化させる作用を有する安定化剤を共存させることができる。

これにより、核酸の回収量及び回収効率が向上し、検体の微量化及び迅速化が可能となる。

#### 【0041】

ヌクレアーゼの不活性化剤としては、一般的に還元剤を好ましく用いることができる。還元剤としては、水素、ヨウ化水素、硫化水素、水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素ナトリウム等の水素化合物、アルカリ金属、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム、亜鉛等の電氣的陽性の大きい金属、またはそのアマルガム、アルデヒド類、糖類、ギ酸、シュウ酸などの有機酸化物、等が上げられるが、メルカプト化合物が好ましい。メルカプト化合物は、N-アセチルシステイン、メルカプトエタノールや、アルキルメルカプタン等が上げられるが、特に限定されない。メルカプト化合物は、前処理液として、0.1~20%の質量濃度で、より好ましくは、0.5~15質量%で用いることができる。

#### 【0042】

上記核酸可溶化試薬には、消泡剤を含有させることも好ましい。上記消泡剤としては、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分が好ましく挙げられ、また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤が好ましい。

#### 【0043】

消泡剤の具体例としては、シリコン系消泡剤（例えば、シリコンオイル、ジメチルポリシロキサン、シリコンエマルジョン、変性ポリシロキサン、シリコンコンバウンドなど）、アルコール系消泡剤（例えば、アセチレングリコール、ヘプタノール、エチルエキサノール、高級アルコール、ポリオキシアルキレングリコールなど）、エーテル系消泡剤（例えば、ヘプチルセロソルブ、ノニルセロソルブ- $\beta$ -ヘプチルコリビトールなど）、油脂系消泡剤（例えば、動植物油など）、脂肪酸系消泡剤（例えば、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸など）、金属セッケン系消泡剤（例えば、ステアリン酸アルミ、ステアリン酸カルシウムなど）、脂肪酸エステル系消泡剤（例えば、天然ワックス、トリブチルホスフェートなど）、リン酸エステル系消泡剤（例えば、オクチルリン酸ナトリウムなど）、アミン系消泡剤（例えば、ジアミルアミンなど）、アミド系消泡剤（例えば、ステアリン酸アミドなど）、その他の消泡剤（例えば、硫酸第二鉄、ボーキサイトなど）などが挙げられる。特に好ましくは、消泡剤として、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分を組み合わせて使用することができる。また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤を使用することも好ましい。

#### 【0044】

また、上記の核酸可溶化試薬溶液は水溶性有機溶媒を含んでいても良い。この水溶性有機溶媒は、核酸可溶化試薬に含まれる各種試薬の溶解性を上げることを目的としており、アセトン、クロロホルム、ジメチルホルムアミド等が挙げられるが、アルコールが好ましい。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでも良い。アルコールがメチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール及びその異性体、ブチルアルコール及びその異性体をより好ましく用いることができる。これらの水溶性有機溶媒は単独または複数組み合わせ用いてもよい。これら水溶性有機溶媒の核酸可溶化試薬溶液における濃度は1~20質量%であることが好ましい。

#### 【0045】

上記の核酸可溶化試薬溶液は、好ましくはpH3~8、より好ましくはpH4~7、さらに好ましくはpH5~6のものが用いられる。

#### 【0046】

細胞膜・核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程について説明する。細胞膜・核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、検体をホモジナイズ処理することで、自動化処理適正が向上する。ホモジナイズ処理は、例えば、超音波処理、鋭利な突起物を用いる、高速攪拌処理を用いる、微細空隙から押し出す処理、ガラスビーズを用いる処理等で行うことができる。

#### 【0047】

ホモジナイズした検体とカオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤及び／または核酸安定

化剤を含む核酸可溶化試薬とを混合する方法は、特に限定されない。混合する際、攪拌装置により30から3000rpmで1秒から3分間混合することが好ましい。これにより、分離精製される核酸収量を増加させることができる。または、転倒混和を5から30回行うことで混合することも好ましい。また、ビベッティング操作を、10から50回行うことによっても混合することができる、この場合、簡便な操作で分離精製される核酸収量を増加させることができる。

#### 【0048】

細胞膜・核膜を溶解し、核酸を可溶化して、検体から核酸を含む試料溶液を得る工程において、次に上記混合液に水溶性有機溶媒を添加する。混合液に添加する水溶性有機溶媒は、アルコールを好ましく用いることができる。アルコールは、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでもよく、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、ブチルアルコール及びその異性体を好ましく用いることができる。これら水溶性有機溶媒の核酸を含む試料溶液における最終濃度は、5～90質量%であることが好ましい。

#### 【0049】

また、得られた核酸を含む試料溶液は、表面張力は50dyne/cm以下であることが好ましく、また、粘度は、1～10000mPaであることが好ましく、比重は、0.8～1.2であることが好ましい。こうした物性の溶液にすることで、次の工程において、試料溶液を核酸吸着性多孔膜に接触後に、試料溶液を除去しやすくする。

#### 【0050】

以下に、本発明で用いる核酸吸着性多孔膜および吸着工程について説明する。

本発明の核酸吸着性多孔膜は、溶液が内部を通過可能なものである。ここで「溶液が内部を通過可能」とは、膜の一方の面が接する空間と膜の他方の面が接する空間の間に圧力差を生じさせた場合に、高圧の空間側から低圧の空間側へと、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。または、膜に遠心力を掛けた場合に、遠心力の方向に、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。

#### 【0051】

また、本発明の核酸吸着性多孔膜は、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔膜であることが好ましい。これは、多孔膜側の使用条件で「イオン化」していないことを意味し、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔膜が引き合うようになると推定される。これにより分離性能に優れ、しかも洗浄効率よく、核酸を単離精製することができる。好ましくは、核酸吸着性多孔膜は、親水基を有する多孔膜であり、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔膜の親水基同士が引きあうようになると推定される。

#### 【0052】

ここで親水基とは、水との相互作用を持つことができる有極性の基（原子団）を指し、核酸の吸着に関与する全ての基（原子団）が当てはまる。親水基としては、水との相互作用の強さが中程度のもの（化学大事典、共立出版株式会社発行、「親水基」の項の「あまり親水性の強くない基」参照）が良く、例えば、水酸基、カルボキシル基、シアノ基、オキシエチレン基などを挙げることができる。好ましくは水酸基である。

#### 【0053】

本発明において、親水基を有する多孔膜とは、多孔膜を形成する材料自体が、親水性基を有する多孔膜、または多孔膜を形成する材料を処理またはコーティングすることによって親水基を導入した多孔膜を意味する。多孔膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでも良い。例えば、多孔膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔膜、親水基を持たない有機材料の多孔膜を処理して親水基を導入した多孔膜、親水基を持たない無機材料の多孔膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔膜、多孔膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔膜、親水基を持たない無機材料の多孔膜を処理して親水基を導入した多孔膜、親水基を持たない無機材料の多孔膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔膜などを、使用

することができるが、加工の容易性から、多孔膜を形成する材料は有機高分子などの有機材料を用いることが好ましい。

#### 【0054】

親水基を有する材料の多孔膜としては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などで、形成された多孔膜を挙げることができるが、特に水酸基を有する有機材料の多孔膜を好ましく使用することができる。

#### 【0055】

水酸基を有する有機材料の多孔膜として、多糖構造を有する材料が好ましく、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物から成る有機高分子の多孔膜をより好ましく使用することができる。アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロースの混合物を好ましく使用する事ができる。特にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合物を好ましく使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比（質量比）は、99：1～1：99である事が好ましく、90：10～50：50である事が好ましい。

#### 【0056】

更に好ましい水酸基を有する有機材料としては、特開2003-128691号公報に記載のアセチルセルロースの鹼化物が挙げられる。アセチルセルロースの鹼化物とは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹼化処理したものであり、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の鹼化物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹼化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹼化物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹼化物も好ましく使用することができる。より好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の鹼化物を使用することである。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比（質量比）は、99：1～1：99であることが好ましい。更に好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比は、90：10～50：50であることである。この場合、鹼化処理の程度（鹼化率）で固相表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。核酸の分離効率をあげるためには、水酸基の量（密度）が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロースなどのアセチルセルロースの場合には、鹼化率（表面鹼化率）が約5%以上であることが好ましく、10%以上であることが更に好ましい。また、水酸基を有する有機高分子の表面積を大きくするために、アセチルセルロースの多孔膜を鹼化処理することが好ましい。この場合、多孔膜は、表裏対称性の多孔膜であってもよいが、裏非対称性の多孔膜を好ましく使用することができる。

#### 【0057】

鹼化処理とは、アセチルセルロースを鹼化処理液（例えば水酸化ナトリウム水溶液）に接触させることを言う。これにより、鹼化処理液に接触したセルロースのエステル誘導体のエステル基が加水分解され、水酸基が導入され再生セルロースとなる。こうして作成された再生セルロースは、本来のセルロースとは、結晶状態等の点で異なっている。また、鹼化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度や処理時間を変えて鹼化処理を行えば良い。鹼化率は、NMR、IR又はXPSにより、容易に測定することができる（例えば、カルボニル基のピーク減少の程度で定めることができる）。

#### 【0058】

親水基を持たない有機材料の多孔膜に親水基を導入する方法として、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有すグラフトポリマー鎖を多孔膜に結合することができる。有機材料の多孔膜にグラフトポリマー鎖を結合する方法としては、多孔膜とグラフトポリマー鎖とを

化学結合させる方法と、多孔膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させグラフトポリマー鎖とする2つの方法がある。

#### 【0059】

まず、多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる方法においては、ポリマーの末端または側鎖に多孔膜と反応する官能基を有するポリマーを使用し、この官能基と、多孔膜の官能基とを化学反応させることでグラフトさせることができる。多孔膜と反応する官能基としては、多孔膜の官能基と反応し得るものであれば特に限定はないが、例えば、アルコキシシランのようなシランカップリング基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、リン酸基、エポキシ基、アリル基、メタクリロイル基、アクリロイル基等を挙げることができる。ポリマーの末端、または側鎖に反応性官能基を有するポリマーとして特に有用な化合物は、トリアルコキシシリル基をポリマー末端に有するポリマー、アミノ基をポリマー末端に有するポリマー、カルボキシル基をポリマー末端に有するポリマー、エポキシ基をポリマー末端に有するポリマー、イソシアネート基をポリマー末端に有するポリマーが挙げられる。この時に使用されるポリマーとしては、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、具体的には、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレンなどを挙げることができる。

#### 【0060】

多孔膜を基点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させ、グラフトポリマー鎖を形成させる方法は、一般的には表面グラフト重合と呼ばれる。表面グラフト重合法とは、プラズマ照射、光照射、加熱などの方法で基材表面上に活性種を与え、多孔膜と接するように配置された重合可能な二重結合を有する化合物を重合によって多孔膜と結合させる方法を指す。基材に結合しているグラフトポリマー鎖を形成するのに有用な化合物は、重合可能な二重結合を有しており、核酸の吸着に関与する親水基を有するという、2つの特性を兼ね備えていることが必要である。これらの化合物としては、分子内に二重結合を有していれば、親水基を有するポリマー、オリゴマー、モノマーのいずれの化合物をも用いることができる。特に有用な化合物は親水基を有するモノマーである。特に有用な親水基を有するモノマーの具体例としては、次のモノマーを挙げることができる。例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸性基含有モノマーを特に好ましく用いることができる。また、アクリル酸、メタアクリル酸等のカルボキシル基含有モノマー、もしくはそのアルカリ金属塩及びアミン塩も好ましく用いることができる。

#### 【0061】

親水基を持たない有機材料の多孔膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができるが、多糖構造を有するポリマーが好ましい。

#### 【0062】

また、親水基を持たない有機材料の多孔膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理することもできる。この場合、鹸化率が約5%以上であることが好ましい。さらには、鹸化率が約10%以上であることが好ましい。

#### 【0063】

親水基を有する無機材料である多孔膜としては、シリカ化合物を含有する多孔膜を挙げ

ることができる。シリカ化合物を含有する多孔膜としては、ガラスフィルターを挙げることができる。また、特許公報第3058342号に記載されているような、多孔質のシリカ薄膜を挙げることができる。この多孔質のシリカ薄膜とは、二分子膜形成能を有するカチオン型の両親媒性物質の展開液を基板上に展開した後、基板上の液膜から溶媒を除去することによって両親媒性物質の多層二分子膜薄膜を調整し、シリカ化合物を含有する溶液に多層二分子膜薄膜を接触させ、次いで前記多層二分子膜薄膜を抽出除去することで作製することができる。

#### 【0064】

親水基を持たない無機材料の多孔膜に親水基を導入する方法としては、多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する2つの方法がある。多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合にて付着させる場合は、グラフトポリマー鎖の末端の官能基と反応する官能基を無機材料に導入し、そこにグラフトポリマーを化学結合させる。また、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する場合は、二重結合を有する化合物を重合する際の起点となる官能基を無機材料に導入する。

#### 【0065】

親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーとしては、上記、親水基を持たない有機材料の多孔膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法において、記載した親水性基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを好ましく使用することができる。

#### 【0066】

親水基を持たない無機材料の多孔膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物などを挙げることができる。

#### 【0067】

また、親水基を持たない無機材料の多孔膜に、アセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたは、アセチル価の異なるアセチルセルロースの混合物を鹸化処理することもできる。この場合、鹸化率が約5%以上であることが好ましい。さらには、鹸化率が約10%以上であることが好ましい。

#### 【0068】

親水基を持たない無機材料の多孔膜としては、アルミニウム等の金属、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックス、もしくはニューセラミックス、シリコン、活性炭等を加工して作製した多孔膜を挙げることができる。

#### 【0069】

上記の核酸吸着性多孔膜は、溶液が内部を通過可能であり、厚さが $10\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ である。さらに好ましくは、厚さが $50\mu\text{m}$ ～ $250\mu\text{m}$ である。洗浄がし易い点で、厚さが薄いほど好ましい。

#### 【0070】

上記の溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、最小孔径が $0.22\mu\text{m}$ 以上である。さらに好ましくは、最小孔径が $0.5\mu\text{m}$ 以上である。また、最大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔膜を用いる事が好ましい。これにより、核酸が吸着するのに十分な表面積が得られるとともに、目詰まりし難い。さらに好ましくは、最大孔径と最小孔径の比が5以上である。

#### 【0071】



上記の溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、空隙率が50～95%である。さらに好ましくは、空隙率が65～80%である。また、バブルポイントが、 $0.1 \sim 10 \text{ kgf/cm}^2$ である事が好ましい。さらに好ましくは、バブルポイントが、 $0.2 \sim 4 \text{ kgf/cm}^2$ である。

#### 【0072】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、圧力損失が、 $0.1 \sim 100 \text{ kPa}$ である事が好ましい。これにより、過圧時に均一な圧力が得られる。さらに好ましくは、圧力損失が、 $0.5 \sim 50 \text{ kPa}$ である。ここで、圧力損失とは、膜の厚さ $100 \mu\text{m}$ あたり、水を通わせるのに必要な最低圧力である。

#### 【0073】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、 $25^\circ\text{C}$ で $1 \text{ kg/cm}^2$ の圧力で水を通させたときの透水量が、膜 $\text{cm}^2$ あたり1分間で $1 \sim 5000 \text{ mL}$ であることが好ましい。さらに好ましくは、 $25^\circ\text{C}$ で $1 \text{ kg/cm}^2$ の圧力で水を通させたときの透水量が、膜 $\text{cm}^2$ あたり1分間で $5 \sim 1000 \text{ mL}$ である。

#### 【0074】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、多孔膜 $1 \text{ mg}$ あたりの核酸の吸着量が $0.1 \mu\text{g}$ 以上である事が好ましい。さらに好ましくは、多孔膜 $1 \text{ mg}$ あたりの核酸の吸着量が $0.9 \mu\text{g}$ 以上である。

#### 【0075】

上記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、一辺が $5 \text{ mm}$ の正方形の多孔膜をトリフルオロ酢酸 $5 \text{ mL}$ に浸漬したときに、1時間以内では溶解しないが48時間以内に溶解するセルロース誘導体が、好ましい。また、一辺が $5 \text{ mm}$ の正方形の多孔膜をトリフルオロ酢酸 $5 \text{ mL}$ に浸漬したときに1時間以内に溶解するが、ジクロロメタン $5 \text{ mL}$ に浸漬したときには24時間以内に溶解しないセルロース誘導体がさらに好ましい。

#### 【0076】

核酸吸着性多孔膜中を、核酸を含む試料溶液を通させる場合、試料溶液を一方の面から他方の面へと通過させることが、液を多孔膜へ均一に接触させることができる点で、好ましい。核酸吸着性多孔膜中を、核酸を含む試料溶液を通させる場合、試料溶液を核酸吸着性多孔膜の孔径が大きい側から小さい側に通過させることが、目詰まりし難い点で好ましい。

#### 【0077】

核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔膜を通させる場合の流速は、液の多孔膜への適切な接触時間を得るために、膜の面積 $\text{cm}^2$ あたり、 $2 \sim 1500 \mu\text{L/sec}$ である事が好ましい。液の多孔膜への接触時間が短すぎると十分な分離精製効果が得られず、長すぎると操作性の点から好ましくない。さらに、上記流速は、膜の面積 $\text{cm}^2$ あたり、 $5 \sim 700 \mu\text{L/sec}$ である事が好ましい。

#### 【0078】

また、使用する溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜は、1枚であってもよいが、複数枚を使用することもできる。複数枚の核酸吸着性多孔膜は、同一のものであっても、異なるものであってもよい。

#### 【0079】

複数枚の核酸吸着性多孔膜は、無機材料の核酸吸着性多孔膜と有機材料の核酸吸着性多孔膜との組合せであっても良い。例えば、ガラスフィルターと再生セルロースの多孔膜との組合せを挙げることができる。また、複数枚の核酸吸着性多孔膜は、無機材料の核酸吸着性多孔膜と有機材料の核酸非吸着性多孔膜との組合せであってもよい、例えば、ガラスフィルターと、ナイロンまたはポリスルホンの多孔膜との組合せを挙げることができる。

#### 【0080】

少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。また、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。



。この場合、少なくとも二個の開口を有する容器内に収容される複数枚の核酸吸着性多孔膜は、同一のものであっても、異なるものであっても良い。

#### 【0081】

核酸分離精製カートリッジは、少なくとも二個の開口を有する容器内に、上記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔膜を収容する以外、その他の部材を収容していないことが好ましい。上記の容器の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニルなどのプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好ましく使用することができる。また、上記の容器は透明であっても、着色してあっても良い。

#### 【0082】

核酸分離精製カートリッジとして、個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段を備えている核酸分離精製カートリッジを使用する事ができる。個々の核酸分離精製カートリッジを識別する手段としては、バーコード、磁気テープなどが挙げられる。

#### 【0083】

また、少なくとも二個の開口を有する容器内から核酸吸着性多孔膜を容易に取り出す事が可能になっている構造を有した核酸分離精製カートリッジを使用することもできる。

#### 【0084】

以下、洗浄工程について説明する。

本発明に従い、本発明の洗浄液を核酸吸着性多孔膜に通過させることにより、DNAを溶離させ、RNAのみを吸着させておき、必要な核酸を含む検体の量を微量とすることができる。即ち、洗浄液を流した液はDNAを分離することが可能となる。

#### 【0085】

本発明の洗浄液は、水溶性有機溶媒を50質量%以下の濃度で含有する水溶液であり、好ましくは水溶性有機溶媒を1質量%以上50質量%以下の濃度で含有する水溶液である。洗浄液は、核酸吸着性多孔膜に核酸と共に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する必要がある。そのためには、核酸吸着性多孔膜から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成であることが必要である。

#### 【0086】

洗浄液中に含まれる水溶性有機溶媒の割合が多すぎると、洗浄工程でDNAが溶離できない。従って、回収液で回収したRNA液中にDNAのコンタミが増大する。また少なすぎると、洗浄工程でDNAだけでなく、RNAが多孔膜から脱着してしまい、回収液中のRNA量が減ってしまう。そのため、洗浄液中に含まれる水溶性有機溶媒の割合は50質量%以下であり、好ましくは20~40質量%である。

#### 【0087】

洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-イソプロパノール、ブタノール、などのアルコールを用いることができ、中でもエタノールを用いることが好ましい。

#### 【0088】

本発明の洗浄液は、更に水溶性塩を含有することが好ましい。水溶性塩としては、ハロゲン化物の塩であることが好ましく、中でも塩化物が好ましい。また、水溶性塩は、一価または二価のカチオンであることが好ましく、特にアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩が好ましく、中でもナトリウム塩及びカリウム塩が好ましくナトリウム塩が最も好ましい。

水溶性塩が洗浄液中に含まれる場合、その濃度は10mM/L以上であることが好ましく、その上限は不純物の溶解性を損なわない範囲であれば特に問わないが、1M/L以下であることが好ましく、0.1M/L以下であることがより好ましい。より好ましくは、水溶性塩が塩化ナトリウムであり、さらには、塩化ナトリウムが20mM/L以上含まれていることである。

#### 【0089】

更に、洗浄液は、カオトロピック物質を含んでいないことを特徴とする。それによって、洗浄工程に引き続く回収工程にカオトロピック物質が混入する可能性を減らすことがで

きる。回収工程時に、カオトロピック物質が混入すると、しばしばPCR反応等の酵素反応を阻害するので、後の酵素反応等を考慮すると洗浄液にカオトロピック物質を含まないことが理想的である。また、カオトロピック物質は、腐食性で有害であるので、この点でもカオトロピック物質を用いないで済むことは、実験者にとっても試験操作の安全上極めて有利である。

ここで、カオトロピック物質とは、前記したように尿素、イソチオシアン酸グアニジン、チオシナア酸グアニジン、イソチアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウムなどである。

#### 【0090】

従来、核酸分離精製工程における洗浄工程の際、洗浄液がカートリッジなどの容器に対する濡れ性が高いため、しばしば洗浄液が容器中に残留することになり、洗浄工程に続く回収工程への洗浄液の混入して核酸の純度の低下や次工程における反応性の低下などの原因となっている。したがって、カートリッジなどの容器を用いて核酸の吸着及び脱着を行う場合、吸着、洗浄時に用いる液、特に洗浄液が、次の工程に影響を及ぼさないように、カートリッジ内に洗浄残液が残留しないことは重要である。

#### 【0091】

したがって、洗浄工程における洗浄液が次工程の回収液に混入することを防止して、洗浄液のカートリッジ内への残留を最小限に留めるため、洗浄液の表面張力を35 dyne/cm未満にすることが好ましい。表面張力が低いと、洗浄液とカートリッジの濡れ性が向上し、残留する液量を抑えることができる。

#### 【0092】

ここで、洗浄効率を上げる為に、水の割合を増やすことができるが、この場合、洗浄液の表面張力は上昇し、残留する液量が増える。洗浄液の表面張力が35 dyne/cm以上の場合は、カートリッジの撥水性を高めることで、残留する液量を抑えることができる。カートリッジの撥水性を高めることで、液滴を形成させ、その液滴が流れ落ちることによって残留する液量が抑制できる。撥水性を高める方法としては、カートリッジ表面にシリコン等の撥水剤をコートするか、カートリッジ成型時にシリコン等の撥水剤を練り込む等の手段があるが、これに限らない。

#### 【0093】

また、洗浄や回収操作を自動化することによって、操作が簡便かつ迅速に行うことが可能になる。洗浄工程は、迅速化のためには1回の洗浄で済ませてもよく、また純度がより重要な場合には複数回洗浄を繰り返すことが好ましい。

#### 【0094】

洗浄工程において、洗浄液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジへ供給される。供給された洗浄液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスポイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、洗浄液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より洗浄液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が洗浄効率が優れてより好ましい。洗浄工程における洗浄液の液量は、 $2\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 以上が好ましい。洗浄液量が多量であれば洗浄効果は向上するが、操作性を保ち、試料の流出を抑止するためには、 $200\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 以下が好ましい。

#### 【0095】

洗浄工程において、洗浄液を核酸吸着性多孔膜に通過させる場合の流速は、膜の単位面積（ $\text{cm}^2$ ）あたり、 $2\sim 1500\mu\text{L}/\text{sec}$ であることが好ましく、 $5\sim 700\mu\text{L}/\text{sec}$ であることがより好ましい。通過速度を下げて時間を掛ければ洗浄がそれだけ十分に行なわれることにな

るが、核酸の分離精製操作の迅速化も重要であるので上記した範囲が選択される。

#### 【0096】

洗浄工程において、洗浄液の液温は4〜70℃であることが好ましい。さらには、洗浄液の液温を室温とすることがより好ましい。また洗浄工程において、その核酸分離精製カートリッジを器械的な振動や超音波による攪拌を与えながら、または遠心分離により洗浄することもできる。

#### 【0097】

本発明に従い、核酸吸着性多孔膜を利用することにより洗浄工程を簡素化することができる。すなわち、(1)洗浄液が核酸吸着性多孔膜を通過する回数を1回でよい、(2)洗浄工程を室温でできる。(3)洗浄後、直ちに回収液をカートリッジに注入することができる。(4)前記(1)、(2)、(3)のいずれか1つもしくは2つ以上のも可能である。従来法においては、洗浄液中に含まれる有機溶媒を迅速に取り除くため、しばしば乾燥工程を必要としたが、本発明に係る核酸吸着性多孔膜は薄膜であるためにこれを省略できるからである。

#### 【0098】

従来、核酸分離精製工程において、洗浄工程の際、しばしば洗浄液が飛散し他に付着することによって、試料のコンタミネーション（汚染）が起きることが問題となっている。洗浄工程におけるこの種のコンタミネーションは、二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと廃液容器の形状とを工夫することによって抑止することができる。

#### 【0099】

次いで、核酸吸着性多孔膜からRNAを脱着させて回収する工程について示す。

回収工程において、回収液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔膜を装着した核酸分離精製カートリッジへ供給される。回収液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスボイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、回収液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より回収液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が回収効率が優れてより好ましい。

#### 【0100】

検体から調整した核酸を含む試料溶液の体積に対して、回収液の体積を調整して核酸の脱着を行うことができる。分離精製された核酸を含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100 $\mu$ lであるが、検体量が極微量である時や、逆に大量の核酸を分離精製したい場合には回収液量は1 $\mu$ lから数10mlの範囲で変える事ができる。

#### 【0101】

回収液としては好ましくは精製蒸留水、Tris/EDTAバッファー等が使用できる。また、回収した核酸をPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）に供する場合、PCR反応において用いる緩衝溶液（例えば、KCl 50mmol/L、Tris-HCl 10mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 1.5mmol/Lを最終濃度とする水溶液）を用いることもできる。

#### 【0102】

回収液のpHは、pH2〜11であることが好ましい。さらには、pH5〜9であることが好ましい。回収液は、500mmol/L以下のイオン強度であることが好ましく、更には50〜0.01mmol/Lの塩濃度であることが好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着核酸の溶出に効果を及ぼす。回収液は、290mmol/L以下のイオン強度であることが好ましく、さらには、90mmol/L以下の塩濃度であることが好ましい。こうすることで、核酸の回収率が向上し、より多くの核酸を回収することができる。

### 【0103】

回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液の体積と比較して少なくすることによって、濃縮された核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積)：(試料溶液体積)=1：100～99：100、更に好ましくは、(回収液体積)：(試料溶液体積)=1：10～9：10にすることができる。これにより核酸分離精製後工程において濃縮のための操作をすることなく、簡単に核酸を濃縮できる。これらの方法により検体よりも核酸が濃縮されている核酸溶液を得る方法を提供できる。

### 【0104】

また別の方法としては、回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液よりも多い条件で核酸の脱着を行うことにより、希望の濃度の核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積)：(試料溶液体積)=1：1～50：1、更に好ましくは、(回収液体積)：(試料溶液体積)=1：1～5：1にすることができる。これにより核酸分離精製後に濃度調整をする煩雑さがなくなるというメリットを得られる。更に、十分量の回収液を使用することにより、多孔膜からの核酸回収率の増加を図ることができる。

### 【0105】

また、目的に応じて回収液の温度を変化させることで簡便に核酸を回収することができる。例えば、回収液の温度を0～10℃にして多孔膜からの核酸の脱着を行うことで、酵素による分解を防止する何らかの試薬や特別な操作を加えることなく核酸分解酵素の働きを抑制して、核酸の分解を防ぎ、簡便に、効率よく核酸溶液を得ることができる。

### 【0106】

また、回収液の温度を10～35℃とした場合、一般的な室温で核酸の回収を実施することが出来、複雑な工程を必要とせずに核酸を脱着させて分離精製することができる。

### 【0107】

また別の方法としては、回収液の温度を高温、例えば35～70℃することで、多孔膜からの核酸の脱着を煩雑な操作を経ず簡便に高い回収率で実施することができる。

### 【0108】

回収液の注入回数は限定されるものではなく、1回でも複数回でもよい。通常、迅速、簡便に核酸を分離精製する場合は、1回の回収で実施するが、大量の核酸を回収する場合等複数回にわたり回収液を注入する事がある。

### 【0109】

回収工程においては、核酸の回収液をその後の後工程に使用できる組成にしておくことが可能である。分離精製された核酸は、しばしばPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法により増幅される。この場合、分離精製された核酸溶液はPCR法に適したバッファー液で希釈する必要がある。本方法による回収工程において、回収液にPCR法に適したバッファー液を用いることで、その後のPCR工程へ簡便、迅速に移行することができる。

### 【0110】

また、回収工程において、核酸の回収液に回収した核酸の分解を防ぐための安定化剤を添加しておくことも可能である。安定化剤としては、抗菌剤、抗カビ剤や核酸分解抑制剤などを添加することができる。核酸分解酵素の阻害剤としてはEDTAなどが上げられる。また別の実施態様として、回収容器にあらかじめ安定化剤を添加しておくこともできる。

### 【0111】

また、回収工程で用いられる回収容器には特に限定はないが、260nmの吸収が無い素材で作製された回収容器を用いることができる。この場合、回収した核酸溶液の濃度を、他の容器に移し替えずに測定できる。260nmに吸収のない素材は、例えば石英ガラス等が挙げられるがそれに限定されるものではない。

### 【0112】

上記の、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程は、工程を自動で行う自動装置を用いて行うことが好ましい。それにより、操作が簡便化

および迅速化するだけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の、核酸を得ることが可能になる。

#### 【0113】

以下に、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程を自動で行う自動で行う自動装置の例を示すが、自動装置はこれの限定されるものではない。

#### 【0114】

自動装置は、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用い、該核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入し加圧して該試料液中の核酸を前記核酸吸着性多孔膜に吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して不純物を除去した後、前記核酸分離精製カートリッジに、回収液を分注し核酸吸着性多孔膜に吸着した核酸を脱着して回収液とともに回収する、分離精製動作を自動的に行う核酸分離精製装置であって、前記核酸分離精製カートリッジ、前記試料液および洗浄液の排出液を収容する廃液容器および前記核酸を含む回収液を収容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収液を分注する分注機構とを備えてなることを特徴とするものである。

#### 【実施例】

#### 【0115】

##### (1) 核酸精製カートリッジの作製

内径7mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸精製カートリッジを作製する。

#### 【0116】

(2) 核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースの多孔膜を鹼化処理した多孔膜を使用し、上記(1)で作成した核酸精製カートリッジの核酸吸着性多孔膜収納部に収容する。

#### 【0117】

##### (3) 核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液の調製

下記に示す処方 of 核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

#### 【0118】

##### (核酸可溶化試薬溶液)

塩酸グアニジン (ライフテクノロジー社製)	382g
Tris (ライフテクノロジー社製)	12.1g
Triton-X100 (ICN製)	10g
蒸留水	1000mlになるように添加

#### 【0119】

##### (洗浄液)

10mM Tris-HCl	20~50%エタノール
---------------	-------------

#### 【0120】

##### (4) 核酸精製操作

ヒト前骨髄性白血病細胞(HL60)培養液を用意する。細胞数が $1 \times 10^6$ 個になるように調製し、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ フリーPBSで細胞を洗浄する。4℃、300g、5分、スイングローターで遠心し、浮遊細胞をペレット状にした後、上清を除去し、タッピングによって細胞を再懸濁する。ここへ核酸可溶化試薬溶液350 $\mu$ lを加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌する。その後70%エタノール350 $\mu$ lを加え、ボルテックスミキサーで5秒間攪拌する。攪拌後、上記(1)及び(2)で作成した核酸吸着性多孔膜を有する核酸精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜に通過させることで、核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出

する。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に、エタノールを20～50%の濃度で含む洗浄液500 $\mu$ lを注入し、上記一の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。同様の操作を3回繰り返す。続いて、上記核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に回収液100 $\mu$ lを注入し、核酸分離精製カートリッジの上記一の開口に圧力差発生装置を結合して核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。

#### 【0121】

(実施例及び比較例)

上記例における洗浄液として、表1及び表2に示すエタノールの濃度(Tris-HClの濃度は一定)の洗浄液を用いる以外は、上記と同じ条件で、各操作を行った。

#### 【0122】

(5) 回収された核酸のアガロースゲル電気泳動

上記各試料において、回収された洗浄液、回収液中の核酸の量を1%アガロースゲルの電気泳動から、その蛍光強度を求めることで、予めDNA及びRNAの検量線を作成して、その濃度を求めた。表1には、回収液のDNA及びRNA濃度を、表2には、洗浄液のDNA及びRNAの濃度を示した。

#### 【0123】

【表1】

洗浄工程のエタノール濃度	回収液で回収したDNA量	回収液で回収したRNA量( $\mu$ g)
エタノール 20%	0.0	3.2
エタノール 30%	0.2	9.1
エタノール 40%	1.1	8.4
エタノール 50%	2.0	9.2
エタノール 70%	5.2	10.5

#### 【0124】

【表2】

洗浄工程のエタノール濃度	洗浄液で回収したDNA量	洗浄液で回収したRNA量( $\mu$ g)
エタノール 20%	5.1	9.8
エタノール 30%	5.0	0.1
エタノール 40%	2.1	0.5
エタノール 50%	2.0	0.4
エタノール 70%	1.8	0.6

#### 【0125】

表1及び表2の結果から明らかなように、洗浄工程でのエタノール濃度が50質量%以下のときはDNAの混入量が少ない。この結果から、本発明の方法を用いることにより、核酸回収液中のDNAの混入量を減少させ、RNAを選択的に回収することができることが分かる。

一方、洗浄液中のエタノール濃度が50質量%より高いと、DNAのコンタミネーションが多くなることが分かる。